



オートファジーを利用する細胞内物質の選択的分解法

著者	高橋 大輝
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126469

博士論文（要約）

オートファジーを利用する細胞内物質の選択的分解

令和元年度

東北大学大学院生命科学研究科

分子生命科学専攻

高 橋 大 輝

1. 序論

1.1. 細胞内タンパク質の働きを抑制する方法

1.1.1. 標的遺伝子の発現を抑制する方法とその応用 -核酸医薬の現状-

生命科学研究において、遺伝子発現の抑制手法は日常的に用いられる。RNA 干渉 (RNAi) や CRISPR-Cas9 システムが代表的な手法である。創薬研究においても、いくつかの核酸医薬がアメリカ食品医薬局 (FDA) による承認を受けた (Khvorova and Watts, 2017)。核酸医薬は、幅広いタンパク質の mRNA レベルを抑制できるほか、非翻訳 RNA (non-coding RNA) にも対象が広がる (Matsui and Corey, 2017)。しかし、既に細胞内に存在するタンパク質のターンオーバーを待つ必要があり、mRNA レベルでの抑制では迅速なノックダウンはできない。核酸医薬は、生体内安定性や、高額な合成コストなどの問題も抱えている (Nishikawa, 2016)。

1.1.2. タンパク質の機能を抑制する方法 -低分子阻害薬-

医薬のほとんどは標的酵素の阻害剤として働く低分子化合物である。「阻害」は、酵素や受容体では特に有効である。これらには、基質が結合するための「くぼみ」が必ず存在し、そこに阻害剤が基質と競合しながら選択的に結合するためである。低分子化合物は比較的容易に化学合成や構造変換ができ、活性の最適化が効率的に行える。抗体医薬が細胞膜外側のタンパク質を標的にしているのに対し、低分子阻害剤が膜透過性をもち細胞質タンパク質を狙えることは大きな利点である。しかし、低分子阻害剤に適する標的は酵素と受容体に限られ、ヒトプロテオームのうち多くのタンパク質がアンドラッグアブルである。そのことは、低分子阻害剤の最大の課題である (Russ and Lampel, 2005)。

1.1.3. タンパク質を翻訳後分解する方法 -PROTAC による人為的分解-

タンパク質機能の阻害ではなく、標的タンパク質を分解する化合物が注目されている。この手

法は、Targeted protein degradation (TPD) ともよばれる。TPD では、化合物を標的に作用させ、標的タンパク質をユビキチン-プロテアソーム経路 (UPS) へと導いて分解する。具体的な方法論はいくつか報告されているが、PROTAC (proteolysis targeting chimera) を用いる方法が最もよく研究されている (Toure and Crews, 2016)。PROTAC とは「標的に結合する低分子リガンド」と「ユビキチン化を促すタグ」とを連結したキメラ分子である。「ユビキチン化を促すタグ」とは、ユビキチン化を触媒する酵素 (ユビキチンリガーゼ) に結合する低分子リガンドである。PROTAC により、標的タンパク質とユビキチンリガーゼを接近させると、標的へのユビキチン化が誘導される。たとえば、E3 ユビキチンリガーゼ CRBN (Cereblon) のリガンドであるサリドマイドが「ユビキチン化を促すタグ」として使われる。

Bradner らが、Brd4 (標的タンパク質) に対するリガンド JQ1 とサリドマイドとを連結して作製した PROTAC (dBET1) は、ヒト白血病細胞 MV4;11 細胞に対して 100 nM の低濃度処理で、Brd4 レベルを 90% 減少させた。Brd4 は、がん細胞の増殖に関わるプロモドメインタンパク質のひとつで、dBET1 は、マウスに植え付けた腫瘍を著しく縮小させた (Winter et al., 2015a)。

標的分解に基づくこの技術は、これまでのタンパク質機能阻害に依存する創薬を革新する。しかし、分解にあたって、UPS を使うことは分解対象の制限にもつながる。プロテアソームは、筒状のプロテアーゼ複合体であり、内部を通過するのはフォールディングが解けた状態のタンパク質に限られるからである (McNaught et al., 2001)。このため、タンパク質凝集体や細胞小器官は UPS 分解の範疇ではない。細胞内においては、これらの分子を分解するためにはオートファジーが働いている。

1.1.4. オートファジーにもとづく創薬への期待と課題

オートファジーは、プロテアソームと並ぶ主要な分解経路である (Mizushima and Komatsu, 2011)。細胞質に作られる二重の膜構造 (隔離膜) が細胞質の一部をランダムに囲みこみ、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームはリソソームと融合し、中身は加水分解酵素で分解される。

オートファジーの主な役割として、飢餓応答の役割が酵母で研究されてきたが、多細胞生物では、恒常性のため個々の細胞が外界の環境変化の影響を受けにくい。飢餓応答の重要性は単細胞生物ほど大きくないと考えられる。細胞内の有害物、例えば、タンパク質凝集体や機能不全細胞小器官、感染細菌は、神経変性疾患をはじめとする多くの疾患と関連しており(Chan, 2006; Ross and Poirier, 2004)、オートファジーはこれらの選択的隔離・排除を通じて、疾患抑制に貢献している(選択的オートファジー)(Mizushima et al., 2008)。

このような背景からオートファジーの創薬応用にも注目が集まり、多くのオートファジー誘導剤が創薬研究に用いられている。例えば、オートファジー誘導剤であるラパマイシンが疾患の症状を軽減するとの報告がある(Galluzzi et al., 2017)。しかし、ラパマイシンは mTOR の阻害を介して ULK1 を活性化する薬剤であり、mTOR の様々な下流シグナルに影響する可能性があるため、mTOR 阻害を介さずにオートファジーを誘導するカルバマゼピンなどの研究が進められている(Hidvegi et al., 2010)。

一方で、オートファジー誘導剤がランダムな分解を誘導することも課題のひとつである。疾患に関わる有害物と一緒に、細胞生存に重要な因子の過剰分解も予想され、副作用を生む懸念があるからである。オートファジーを利用した医薬品を創り出すには、高い分解選択性が必要である。

1.2. 選択的オートファジー

細胞内の有害物、余剰物のオートファジー分解は、飢餓応答とは異なり、基質選択性が認められる。この選択的オートファジーの代表例として、病原体や機能不全ミトコンドリアの排除が研究されている。医薬品として、特定の物質を分解するには、選択的オートファジーのメカニズムを深く理解する必要がある。

1.2.1. 選択的オートファジーの基質認識機構

1.2.1.1. ユビキチン化

選択的オートファジーの基質は、オートファゴソームに取り込まれる前にユビキチン化を受ける場合が多い(Shaid et al., 2013)。オートファジー不全細胞では、ユビキチン化陽性のタンパク

質凝集体が蓄積することが知られている (Riley et al., 2010)。

ユビキチンは、77 のアミノ酸残基からなる小さなタンパク質で、他のタンパク質の修飾（ユビキチン化）により分解やシグナル伝達を制御している。ユビキチン化は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (E3) の 3 つの酵素によって進行する (Ciechanover, 2015)。被修飾タンパク質においてはリシン側鎖のアミノ基がユビキチン C 末端のグリシンカルボキシル基とアミド結合を形成する。ユビキチンのリシン残基に次のユビキチンが付加されるとポリユビキチン化修飾となるが、7 個あるリシン残基のうち、いずれに次のユビキチンが結合するかによって多様性が生じる。ポリユビキチン鎖の結合様式の多様性はユビキチンコードと呼ばれ、その生物学的意味の解読が進められている。

選択的オートファジーにおいて、基質認識とポリユビキチン鎖の結合様式との関係はよくわかっていないが、特定のユビキチンコードがオートファジー分解に関わっているという考えが最近浸透してきている (Kwon and Ciechanover, 2017)。タンパク質凝集体や傷害されたミトコンドリア周辺には、Lys63 (K63) 型のユビキチン鎖が多く観察されるからである。ここで、K63 型ユビキチン鎖とはユビキチンの 63 番目のリシン残基を介して連結したポリユビキチン鎖である。ごく最近では、選択的オートファジーと細胞内相分離との関係に注目が集まっており、ここでも K63 型ユビキチン鎖が働くという提案がなされている (Sun et al., 2018; Zaffagnini et al., 2018)。

1.2.1.2. アダプタータンパク質

選択的オートファジーにおける基質認識の主役は、「アダプター」と呼ばれるタンパク質である (Stolz et al., 2014)。アダプター分子の一端は、オートファジーの隔離膜に結合し、もう一端が基質に結合する。このため、アダプターと結合できる基質は選択的にオートファジー分解を受けることができる。

アダプタータンパク質の多くは LIR とともにユビキチン結合ドメイン (ubiquitin binding domain: UBD) をもっており、ユビキチン化された基質が優先的にオートファゴソームに運ばれる裏付けになっている。p62/SQSTM1 は、特によく研究されているアダプタータンパク質である。p62 は、液-液相分離を介して選択的オートファジーを促進するという報告が続き、ここで

も K63 型ユビキチン鎖の重要性が指摘されている (Sun et al., 2018; Zaffagnini et al., 2018)。このことは、選択的オートファジーに K63 型ユビキチン鎖が重要であるという考えを支持している。

1.2.2. 抗菌オートファジーにおける基質認識機構

選択的オートファジーの代表例は、抗菌オートファジー（ゼノファジー）である (Levine et al., 2011)。例えば、細胞内に侵入した A 群連鎖球菌（Group A Streptococcus : GAS）は、ファゴソームから脱出後、LC3 陽性のオートファゴソームに捕捉される (Nakagawa et al., 2004)。最終的にアダプターが介在する点では一致しているが、オートファジーが選択的に細菌を捕らえる機構は、細菌の種類によっても多様性がある。細菌がユビキチン修飾を受ける株と、ユビキチン化を介在させない株があり、後者では、galectin 8 などの因子が直接的に細菌を認識すると考えられている (Thurston et al., 2012)。

1.2.3. 当研究室の先行研究

伊藤・斎藤らは A 群連鎖球菌のオートファジーによる排除に「S-グアニル化」とよばれるタンパク質修飾が関与することを提唱した (Ito et al., 2013)。細胞内に侵入した GAS の周りには S-グアニル化が観察され、S-グアニル化を阻害するとユビキチン化や隔離膜の菌周囲へのリクルートが抑制された。また、細菌周囲のユビキチン鎖の形式は K63 型を含むことを明らかにした。これらの結果は、S-グアニル化が GAS 周囲への隔離膜リクルートに欠かせないことを示すが、個々の細菌株を特徴づける生体分子が S-グアニル化と同時に必要と考えることも可能であった。したがって、この修飾が単独で「オートファジーを呼び寄せる能力」を有するか否かは議論の余地がある。

S-グアニル化修飾は、内因性化合物である 8-ニトロ cGMP によるシステインの翻訳後修飾である (Sawa et al., 2007)。8-ニトロ cGMP は、さまざまなストレス因子に応答して、一酸化窒素 (NO) と活性酸素種 (ROS) から細胞内で合成される。異物の存在を認識する自然免疫の活性化によって 8-ニトロ cGMP が生成することは、有害物を排除する選択的オートファジーに S-グ

アニル化に関わることに符合する。

1.2.4. 選択的オートファジーの開始機構

オートファジーに関わるタンパク質は、現在分かっているだけでも 100 を超える。その中でも、オートファジーに必須な遺伝子として autophagy-related gene : Atg が 30 種類以上同定されている (Lamb et al., 2013)。飢餓に応答して起こるオートファジーは、細胞内の栄養状態を感知するシステムによって始まる。哺乳類において、mTORC1 はアミノ酸のセンサー、AMPK はエネルギーレベルのセンサーである。栄養が豊富なときは、アミノ酸やインスリンの働きかけで、mTORC1 が ULK1 と Atg13 をリン酸化するため ULK1 複合体は不活性化されている。これに対して飢餓状態では ULK1 から mTORC1 が離れ、ULK1 の脱リン酸化が促進されるため、オートファジーが誘導される (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009)。ULK1 複合体は、現在知られている唯一のオートファジー開始因子であるため、ある現象の ULK1 複合体への依存性を、オートファジーか否かの判断に用いる研究者が多い (Klionsky et al., 2016; Mizushima et al., 2010)。

選択的オートファジーの動機は「有害物の存在」である。これらは、飢餓状態やエネルギー状態知するための mTORC1 や AMPK などとは本来無関係である。上述したオートファジー開始因子と選択的オートファジーを結びつけるための説明が工夫されている (Mizushima, 2018)。

1.3 本研究が目指したこと

本研究ではまず、S-グアニル化修飾が単独で選択的オートファジーをリクルートするタグであることを証明した。この発見は、S-グアニル化を特定の標的に導入することにより、狙った疾患因子を分解できることを示唆した。しかし、S-グアニル化修飾に含まれる cGMP 構造は、低い膜透過性や望まない生物活性などの課題をもつ。この部分の合成化学的変換を行い、オートファジータグとしてより優れた人工的な改良 S-グアニル化タグを開発することにした。さらに、改良したタグを細胞内のタンパク質やミトコンドリアに導入し、自在にオートファジー分解することを可能にする化合物の開発を進めた。また、S-グアニル化を起点とするオートファジーの開始過

程についても検討した。

2. 本論

2.1. 結果

2.1.1. オートファジー分解の目印としての S-グアニル化

2.1.1.1. HaloTag 技術を利用した S-グアニル化導入による人工基質のオートファジー分解

伊藤らは S-グアニル化が K63-ユビキチン化や選択的な細菌排除のタグであることを示した。残された課題は、細菌由来成分の介在なしに S-グアニル化自体がオートファジーを誘起する「スタンドアロンタグ」であるかを解明することである。8-ニトロ cGMP による細胞内の S-グアニル化とオートファジーの関係は、多数の含 Cys タンパク質に対して S-グアニル化が起こるため、解析が難しかった。そこで、筆者は HaloTag™ (HT) 技術 (Promega) を利用することにした (Los et al., 2008)。一端に S-グアニル化構造をもつ HTL を用いれば、HT 融合タンパク質特異的に S-グアニル化を導入できる。S-グアニル化がオートファジー分解のタグとなるのであれば、HT 融合タンパク質は HTL の存在下でオートファジー関連因子に依存した分解を受けると予想される。

第一に、EGFP-HT 細胞内局在の S-グアニル化による変化を観察した。EGFP-HT を発現した HeLa 細胞に、Cys-S-cGMP 構造を含む HTL (以下 cGMP-HTL) を処理した。6 時間後には EGFP-HT がドット状の局在を示した。このドット状の構造がオートファゴソームへの取り込みによるものかを調べるために、オートファゴソームマーカーである LC3B の局在と比較した。その結果、EGFP-HT と LC3B の共局在が認められた。1.2.1.で述べたように、基質選択的なオートファジーでは、ポリユビキチン化が重要な役割を果たすが、S-グアニル化を介した抗菌オートファジーでは、K63 型ユビキチン化が関与する。そこで、EGFP-HT ドットとユビキチン化の関係を調べると、cGMP-HTL 処理下、K63 型ユビキチン鎖が EGFP-HT ドットに共局在した。なお、E1 ユビキチンリガーゼ阻害剤 PYR-41 (200 nM) 存在下では cGMP-HTL を処理による EGFP-HT の分解は観察されなかった。以上より、S-グアニル化導入タンパク質の分解には、S-

グアニル化に続くユビキチン化が必須であると考えられる。

次に、cGMP-HTL 処理後の EGFP-HT のオートファジー分解を観察するために、EGFP-HT 量をウェスタンブロットにより解析した。S-グアニル化構造をもつ HT タンパク質は、抗 RS-cGMP 抗体により検出できる。また、S-グアニル化修飾された EGFP-HT は、ゲル上で未修飾の EGFP-HT よりも若干高分子側にシフトして観測され、cGMP-HTL の濃度と時間に依存して減少した。分解がオートファジーにもとづくことを確認するため、マクロオートファジーに重要な Atg5 を欠損させたマウス胎児線維芽細胞 (MEF) 細胞で同様の実験を行った。HeLa 細胞と同様に、EGFP-HT のドット状への局在変化や分解が抑制されたことから、S-グアニル化 (cGMP 導入) による基質分解はオートファジー分解によることが分かる。

次に、アダプタータンパク質の関与について検証した。S-グアニル化を介した抗菌オートファジーにおいては、LC3B ドットと p62 の共局在が観察されていたため、本研究では p62 に着目した。cGMP-HTL 存在下、両者の共局在を認めた。EGFP-HT を発現 p62 欠損 MEF 細胞に、cGMP-HTL (10 μ M) を 24 時間処理したところ、EGFP-HT の分解がみられなかった。このことから、S-グアニル化を介する選択的オートファジーにおいて、アダプタータンパク質の中でも p62 が主要なアダプター因子として関与することが示唆された。

2.1.1.2. 基質選択性

観察された EGFP-HT の分解が、S-グアニル化された基質選択的であることを確かめるために、EGFP-HT の一部に S-グアニル化とは無関係の修飾を導入し、修飾による分解の違いを検証した。EGFP-HT が発現した HeLa 細胞に、テトラメチルローダミン基 (TMR) をもつ HTL (TMR-HTL) (2 μ M) と cGMP-HTL (10 μ M) を同時に 6 時間投与した。HT タンパク質は、ひとつの HTL としか反応しないため、細胞内では、cGMP および TMR のいずれか片方の修飾を受けた EGFP-HT が共存することになる。TMR は赤色蛍光色素であるため、TMR が導入された EGFP-HT は TMR 自身の蛍光で検出できる。また、EGFP の緑色蛍光では、どちらの修飾を受けた EGFP-HT も検出できる。もし S-グアニル化選択的な分解であれば、cGMP 構造が導入された EGFP-HT のみが分解を受けると予想される。観察の結果、TMR が導入された EGFP-HT は生

細胞イメージングにおいてドット状構造にならず、電気泳動バンドの蛍光検出でも分解は観察されなかった。一方、緑色蛍光で観察すると、この場合はドット状の構造が認められた。このことから、cGMP 構造が導入された EGFP-HT が TMR 修飾を受けた EGFP-HT と区別されてオートファゴソームに移行したことが分かった。

2.1.2. cGMP 部の構造変換による新規オートファジー分解タグの創製

序論で述べたように、オートファジーを医薬に利用するには、高い基質選択性が重要である。

2.1.1.では、cGMP 構造導入によって EGFP-HT の選択的分解が可能であることを示した。一方で、分解の効率は十分とはいえない。この原因は、cGMP 修飾の EGFP-HT への導入効率が低いことである。S-グアニル化修飾を受けた EGFP-HT は、1 時間の cGMP-HTL 処理で全体の約 20%程度であり、EGFP-HT 全体のレベルの減少はごくわずかである。この問題を解決するために、cGMP-HTL に代わる人工的な S-グアニル化リガンドを開発することにした。筆者は、cGMP 構造のリン酸基の電荷が細胞膜の浸透性を低くしていると考え、リン酸基を含まないグアニン誘導体を HTL と連結して使うことにした。

2.1.2.1. 新規オートファジー分解タグ：*p*-フルオロベンジルグアニン (FBnG) タグ

当研究室では 8-ニトロ cGMP をヒントにして、合成ニトログアニン誘導体を多数合成し、それらのオートファジー誘導能を調べてきた(高橋, 2012)。ここで、化合物 (50 μ M) のオートファジー誘導能を、A549 細胞での LC3B ドット形成数により評価したところ、合成した 12 個の誘導体のうち、8-ニトロ-9-フルオロベンジルグアニンが最も高いオートファジー誘導活性を示した。この誘導体では、環状リン酸基を含むリボースが *p*-フルオロベンジルへと変換されている。本論文では、9-*p*-フルオロベンジルグアニン (FBnG) を HTL に連結して用いた (FBnG-HTL)。この変換により、タグ部分の電荷がなくなり S-グアニル部分の脂溶性が向上することから細胞膜透過性の向上が期待される。細胞内への取り込みが促進されれば、EGFP-HT との反応も促進が期待させる。

2.1.2.2. FBnG タグ導入タンパク質のオートファジー分解

FBnG-HTL や cGMP-HTL の HT 修飾効率を見積もるには、それぞれの HTL を処理後に修飾されずに残った HT 量を測定すればよい。そこで修飾されずに残った HT は、HT タンパク質と速やかに結合する TMR-HTL によって蛍光修飾して検出した。

HT を発現した HeLa 細胞に、cGMP-HTL (2, 10 μ M) または FBnG-HTL (2, 10 μ M) を 6 時間処理し、TMR-HTL (2 μ M) で 1 時間修飾した。FBnG-HTL で修飾した細胞では、cGMP-HTL を処理した細胞と比較して、TMR の導入量が抑えられていたことから、FBnG-HTL はより高い修飾能をもつことが分かる。

次に、2.1.1. 項で見られたように、FBnG-HTL 処理による EGFP-HT の分解がみられるかを HeLa 細胞で検証した。抗 EGFP 抗体を使ったウェスタンブロットにより総 EGFP-HT 量を解析したところ、10 μ M の FBnG-HTL 処理 (24 時間) により 70%以上の EGFP-HT が分解された。また、複数の細胞株で FBnG タグ導入による EGFP-HT の分解がみられたことから、一般性をもって機能することが分かった。

分解に先立ち、FBnG-HTL (10 μ M) 処理した細胞では、LC3, K63 型ユビキチン鎖, p62 陽性の EGFP-HT のドット様共局在も観察された。一方、E1 ユビキチン活性化酵素阻害剤 PYR-41 (200 nM) を用いてユビキチン化を阻害すると、FBnG 修飾による分解が観察されなかったことから、分解はユビキチン化に依存していることが確かめられた。

これらが、オートファジーによる現象なのかどうかを調べるために、EGFP-HT 発現 Atg5 欠損 MEF 細胞に FBnG-HTL (10 μ M) 処理すると、EGFP-HT 分解が抑制された。また、リソソーム機能阻害剤バフィロマイシン A1 (200 nM) 存在下で EGFP-HT 分解が抑えられた。プロテアソーム阻害剤 MG132 (200 nM) で EGFP-HT 分解が阻害されないことから、主要な分解経路がプロテアソームではないことも分かる。さらに、p62 欠損 MEF 細胞でも EGFP-HT の分解が抑制されたことから、FBnG 修飾 EGFP-HT の分解のアダプタータンパク質 p62 への依存性が分かった。以上の結果から、FBnG-HTL による EGFP-HT 分解は、cGMP-HTL と同じく、オートファジー経路を利用していることが示唆される。

2.1.2.3. FBnG 修飾特異的な分解

EGFP-HT の分解が FBnG 修飾特異的であるかどうかを、2.1.1.2. と同様の方法で検証した。EGFP-HT を発現した HeLa 細胞に FBnG-HTL (10 μ M) と TMR-HTL (2 μ M) を同時に処理し、EGFP-HT の局在解析をした。2.2.1.と同様、TMR (赤色) 蛍光は細胞質全体に散在した一方、EGFP (緑色) 蛍光はドット状に局在した。HT タンパク質レベルの解析からも、FBnG-HTL 処理特異的に HT が分解されていることが確認できた。これらのことから、(EGFP-) HT の分解が FBnG 修飾選択的に起きていることが示唆される。

2.1.3. Autophagy targeting chimera (AUTAC) による内因性標的のオートファジー分解

HaloTag 技術を使った 2.2.での実験結果から、基質の S-グアニル化がオートファジー分解の目印としてはたらくことが明らかになった。それに加え、FBnG 構造を用いる改良 S-グアニル化がより優れた分解タグであることも分かった。この FBnG タグを、疾患原因タンパク質に対して特異的に導入できれば、狙った疾患原因タンパク質を選択的にオートファジー分解 (翻訳後ノックダウン) できる。しかし、これまでの HaloTag を用いる手法では、予め HaloTag 融合タンパク質とした標的しか分解できない。筆者は、標的とする内因性タンパク質に FBnG タグを導入するために、「標的に結合する低分子リガンド」と「FBnG タグ」を連結したキメラ化合物を設計した。「低分子リガンド」としては、生物活性天然物や低分子量医薬など、様々な化合物を使うことができる。本研究では、信頼できるリガンドが知られている 3 つのタンパク質を分解標的として選んだ。

2.1.3.1. AUTAC1 による MetAP2 の分解

キメラ分子 AUTAC1 は、methionine aminopeptidase (MetAP2) のリガンド Fumagillol (Sin et al., 1997) を標的リガンドとし、分解タグとして FBnG を連結したキメラ化合物である。MetAP2 は細胞質に発現するため、オートファジーの分解基質に適すると考えた。また、天然物フマギリンの誘導体である Fumagillol は、その構造中のスピロエポキシドが MetAP2 中のヒスチジン残基と共有結合するため、より強固に FBnG タグを MetAP2 に繫留できると考えた。HeLa 細胞に

AUTAC1 を処理すると、処理時間および化合物濃度依存的に標的タンパク質 MetAP2 の分解が観察された。この分解は、オートファジー後期過程阻害剤バフィロマイシン A1 の存在下で顕著に分解が阻害されるため、オートファジー-リソソーム経路による分解と考えられる。

なお、この項の実験は、分子情報化学分野の森山純氏と共同で実施した。

2.1.3.2. AUTAC2 による FKBP12 の分解

キメラ分子 AUTAC2 は、FK506 binding protein 12 (FKBP12) の合成リガンド SLF(Braun et al., 2003)を標的リガンドとし、分解タグとして FBnG を連結したキメラ化合物である。前項の MetAP2 と同様に FKBP12 も細胞質に発現するが、SLF と FKBP12 との結合は非共有結合によるもので、AUTAC1 とは異なっている。HeLa 細胞に AUTAC2 を処理すると、処理時間および化合物濃度依存的に標的タンパク質の分解が観察された。この分解は、オートファジー後期過程阻害剤バフィロマイシン A1 の存在下で顕著に阻害されるため、リソソームによる分解であると考えられる。

なお、この項の実験は、分子情報化学分野の一刀かおり博士と共同で実施した。

2.1.3.3. AUTAC3 による Brd4 の分解

キメラ分子 AUTAC3 は、Bromodomain-containing protein 4 (Brd4) の合成リガンド JQ1-acid(Filippakopoulos et al., 2010; Pérez-Salvia and Esteller, 2017)と FBnG を連結したキメラ化合物である。1.1.3.で述べたように、JQ1 は PROTAC にも用いられるリガンドであるだけでなく、ブロモドメインタンパク質の阻害剤として、癌研究の分野で多くの使用例がある。しかし、先述 2 例と異なり、Brd4 は核内に局在するタンパク質であるため、オートファジーの分解基質となり得るか興味深い。

A549 細胞に AUTAC3 を処理すると、処理時間および化合物濃度依存的に標的タンパク質の分解が観察され、バフィロマイシン A1 の存在下で顕著に分解が阻害されたことから、リソソームでの分解が示唆される。しかし、分解の程度には大きくバラつきがみられた。

筆者は、細胞が、細胞周期のどの段階にあるかが影響すると思った。細胞分裂中の細胞では、

核膜の崩壊とともに Brd4 が細胞質へ放出される。チミジンによる同調培養下、AUTAC3 を処理したところ、細胞分裂期に細胞質へ放出された Brd4 の一部が LC3B と共局在することが分かった。そして、細胞周期上異なる段階にある細胞に AUTAC3 を処理する検討を行った結果、分裂期を経て AUTAC3 を処理した条件でのみ分解が観察された。この結果は、オートファジーによる Brd4 の分解のためには、Brd4 の細胞質への移行が必要であることを示唆する。

標的タンパク質が発現する場所により分解効率に差が現れるかどうか調べるために、核局在化シグナルをもった EGFP-HT (NLS-EGFP-HT) と核外局在シグナルをもった EGFP-HT (NES-EGFP-HT) の分解について検討した。それぞれのシグナルをもった EGFP-HT を発現させた細胞に、cGMP-HTL を処理すると、どちらの局在化シグナルを含む EGFP-HT にも cGMP 修飾されたバンドがみられたが、分解が観察されたのは NES-EGFP-HT だけで、NLS-EGFP-HT の分解は見られなかった。これらの結果は、Brd4 など、核局在タンパク質のオートファジーによる分解は、細胞質性のタンパク質に比べて制限があることを示唆するが、他の核内標的タンパク質の AUTAC による分解が細胞周期に依存するかどうかは不明である。

なお、この項の実験は、分子情報化学分野の中村友恵氏との共同で実施した。

2.1.4. ミトコンドリアの人為的オートファジー分解と疾患治療への可能性

2.1.3.項では、AUTAC 法を用いて細胞内タンパク質の自在分解ができることを立証した。AUTAC の次のステップとして、プロテアソーム分解にはないオートファジーの特徴を生かすことが重要だと考えた。例えば、細胞小器官の分解である。機能不全となった細胞小器官は、オートファジーによる分解を受け、さまざまな疾患を抑制している。AUTAC を使ってこれらの除去をさらに促進できれば、これまでに例のない治療薬になるかもしれない。

筆者は「ミトコンドリア分解」を目指した。ミトコンドリアは、エネルギーの産生や代謝を担う細胞小器官である。また、ミトコンドリアは、細胞死や炎症、自然免疫にも関係するため、ミトコンドリア傷害は様々な疾患の原因となる。本手法によって、異常なミトコンドリアを除去し、正常なミトコンドリアの量を制御できれば、その波及効果は大きい。

2.1.4.1. ミトコンドリア外膜局在 HaloTag を利用したミトコンドリアの人為的分解

筆者の方法でミトコンドリアを分解するには、まず、ミトコンドリア表面に FBnG タグを導入することが必要である。ここでは、2.1.1.や 2.1.2.で用いた HaloTag 技術を採用した。ミトコンドリアは外膜と内膜をもつが、オートファジーが細胞質で起こることを考慮すると、外膜の細胞質側に FBnG タグを導入するのが適切である。そのために、ミトコンドリア外膜タンパク質 Omp25 の N 末に EGFP-HT を融合し、ミトコンドリア外膜から細胞質側に EGFP-HT が突き出すように設計した。EGFP-HT-Omp25 (mito-EGFP-HT) がミトコンドリア上に局在することは、HeLa 細胞に Mito-EGFP-HT を発現させ、MitoTracker Red CMXRos (MTR)の局在と、共局在を確認した。

まず、ミトコンドリアへの LC3B や K63 型ユビキチン鎖がリクルートされるかを検証した。mito-EGFP-HT が発現した HeLa 細胞に FBnG-HTL (10 μ M) を処理すると、LC3B と K63 型ユビキチン鎖がミトコンドリア上に集積した。ミトコンドリア含有画分をウェスタンブロットにおいても、FBnG-HTL を処理した群で K63 型ユビキチン鎖が検出された。FBnG-HTL 処理時と比較して低レベルであるが、cGMP-HTL の処理によっても K63 型ユビキチン鎖の集積を認めた。これらの結果から、ミトコンドリア上に FBnG タグを導入した場合にも、細胞内タンパク質と同様にオートファジーを呼び寄せることができると予想された。

次に、FBnG-HTL 処理によりミトコンドリア分解の有無をウェスタンブロットで調べた。ミトコンドリア分解が起きると、外膜上に存在するタンパク質 (VDAC1, Tom20)、内膜に存在するタンパク質 (Tim17)、マトリクスに存在するタンパク質 (complex III core 1, Hsp60) が揃って減少する。mito-EGFP-HT が発現した HeLa 細胞に FBnG-HTL (10 μ M) を処理し、上で述べたタンパク質のレベルを解析したところ、当初の予想に反して、ミトコンドリアの分解はみられなかった。ミトコンドリアへの LC3B のリクルートは観察されていることから、タンパク質単独の分解とは異なるミトコンドリア分解特有の原因があると考えた。

筆者は、ミトコンドリアの形態とオートファゴソームの大きさの関係に注目した。ミトコンドリア動態は、mitofusin (Mfn) や optic atrophy 1 (OPA1) などの融合因子と、dynamin-1-like

protein (Drp1) などの切断因子により制御され、繊維状の長い形態と断片化した短い形態とを頻繁に行き来している。非ストレス条件にある細胞では、主に長い形態のミトコンドリアが観察される。このようなミトコンドリアはオートファゴソーム (0.5-1 μm) に対して、サイズが大きすぎるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、OPA1 のノックダウンによりミトコンドリア形態を断片化させ、短く維持させることにした。OPA1 は、ミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリア融合時に内膜の融合を司る。OPA1 の短期間のノックダウンでは、細胞に大きなストレスを与えることなくミトコンドリアの断片化を維持することができる (Gripic et al., 2007)。mito-EGFP-HT を発現させた HeLa 細胞に対し、siRNA を導入し OPA1 発現を抑制した。その細胞に FBnG-HTL (10 μM) を処理したところ、予想した通り、ミトコンドリアタンパク質の分解が処理時間・化合物濃度依存的に観察された。一方で、ミトコンドリアの断片化に関わる Drp1 を阻害する化合物：mdivi-1 を処理し、長い形態を維持した時、ミトコンドリアの分解はみられなかった。これらのことから、ミトコンドリアの形態がオートファジーによる分解において重要な因子であることが分かる。

2.1.4.2. K48 型ユビキチン鎖のミトコンドリア分解への関与

1.2.1.1.で述べたように、選択的オートファジーとユビキチン結合様式への理解はよくわかっていない。S-グアニル化を導入すると K63 型ユビキチン鎖のリクルートが顕著に観察されるが、他のユビキチン結合様式を導入した場合には分解が起こらないのだろうか。この点を検証するために、細胞内で最も豊富な結合様式である K48 型ユビキチン鎖をミトコンドリア上に導入することにした。そのために、PROTAC：dBET1 に利用されているサリドマイドを利用した (Winter et al., 2015b)。サリドマイドは、E3 ユビキチンリガーゼ：cereblon (CRBN) のリガンドである。CRBN は、K48 型ユビキチン鎖を標的に付加する酵素であるため、サリドマイド (Thal) をミトコンドリア上に導入すればミトコンドリア表面が K48 型ユビキチン化を受けるはずである。mito-EGFP-HT が発現した HeLa 細胞に Thal-HTL を処理すると、ミトコンドリア上へ K48 型ユビキチン鎖の集積が認められた。続いて、ミトコンドリアタンパク質群の分解をウェスタンブロットにより調べると、OPA1 ノックダウン下であっても分解は全く認められなかった。このこ

とから、K48 型ユビキチン鎖は、ミトコンドリアの分解を誘起しないことが分かった。

2.1.4.3. 傷害ミトコンドリアの分解による細胞保護効果

次に、FBnG タグの導入が傷害を受けたミトコンドリアを除去するか調べた。Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) などの脱共役剤は、ミトコンドリア傷害（膜電位の消失）を引き起こす。このとき、OPA1 の N 末端が切断され融合活性を失いミトコンドリアは断片化する。これにより傷害ミトコンドリアは正常なミトコンドリアから部分的に切り取られて隔離される (asymmetric segregation)。2.1.4.1.において、ミトコンドリアのサイズに依存して分解が起きたことを考えると、傷害ミトコンドリアを選択的に分解できると期待される。その結果、傷害に伴う細胞への保護効果も見られるだろう。

まず、ミトコンドリアタンパク質レベルをウェスタンブロットにより解析した。HeLa 細胞に FBnG-HTL (10 μ M) を 10 時間処理した後、CCCP (10 μ M) を処理した。CCCP 添加から約 2 時間でミトコンドリアタンパク質レベルが減少した。FBnG-HTL (10 μ M) による 10 時間の前処理で、ミトコンドリアタンパク質レベルの減少がみられないことから、CCCP が引き起こしたミトコンドリアの断片化がミトコンドリア分解の引き金になったと考えられる。興味深いことに、CCCP 添加から 4 時間後にはミトコンドリアタンパク質レベルが元のレベルまで回復した。これは、傷害を受けたミトコンドリアの排除だけでなく、新たにミトコンドリアが生合成されたことを意味する。

次に、ミトコンドリアの分解により、ミトコンドリア機能が改善されているかどうか、細胞の生存に効果があるか調べた。ミトコンドリア機能を簡便に解析するために、JC-1 染色を試みた。JC-1 試薬は、膜電位依存的にミトコンドリアに蓄積して赤色蛍光を発する。一方で、ミトコンドリアの膜電位が低下すると細胞質に放出され緑色蛍光を示す。10 時間の FBnG-HTL (10 μ M) 前処理の後 CCCP を添加し、JC-1 染色を実施した。その結果、CCCP 処理後 2 時間以降のミトコンドリア膜電位の低下が、FBnG 修飾を導入により顕著に抑制された。細胞生存率/死滅率は、TUNEL 陽性細胞の割合を計算することで求めた。FBnG-HTL 非処理細胞では、CCCP の処理

により細胞死 (IC_{50} : 13.8 μ M) が認められた。一方, FBnG-HTL (10 μ M) 処理細胞では細胞死が抑えられた (IC_{50} : 81.0 μ M)。この細胞保護効果は, オートファジー後期過程阻害剤バフィロマイシン A1 によって阻害されることから, オートファジーによるミトコンドリア分解による効果であることが示唆される。ミトコンドリア傷害が引き起こす細胞死は, 内膜に存在し電子伝達系に関与する cytochrome c (CytC) が細胞質に漏出することで起こる。細胞質中に流出した CytC はカスパーゼカスケードを活性化することでアポトーシスを誘導するからである。FBnG-HTL (10 μ M) を処理した細胞では, CCCP 処理による細胞質への CytC の放出が観察されなかったことから, 隔離膜が傷害ミトコンドリアを覆い, 分解する過程で CytC の細胞質への漏出が阻止されていると推測される。

2.1.4.4. ミトコンドリアに標的化した AUTAC4 によるミトコンドリア分解

FBnG タグの導入による機能不全 (断片化した) ミトコンドリアの分解が確認できたため, 疾患の原因となる傷害ミトコンドリアを排除する化合物の開発を計画した。そのためには, ミトコンドリアの外膜の表面に結合する低分子化合物が必要である。前項では, ミトコンドリア外膜タンパク質 Omp25 を利用したので, 本来は Omp25 と結合する低分子化合物を用いればよい。しかし, Omp25 に対する信頼できる低分子リガンドが現在見つかっていない。そこで筆者は, ミトコンドリア外膜に発現するトランスロケータータンパク質: TSPO に注目した。このタンパク質は, 肝疾患患者において発現が上昇することが知られ, 脂肪肝などの早期発見のための PET イメージング開発が盛んに行われている (Rupprecht et al., 2010)。その中で, インドールに由来する構造をもつ化合物が TSPO と結合するリガンドとして用いられている。そこで, 先行研究で用いられている化合物を参考に, FBnG タグを連結した AUTAC4 を設計・合成した。

まず, AUTAC4 の処理により K63 型ユビキチン鎖がミトコンドリアにリクルートされるかどうか確認した。HeLa 細胞に AUTAC4 (10 μ M) を処理し, そのミトコンドリア画分をウェスタンブロットにより解析したところ, K63 型のユビキチン化が 8 時間後から顕著に増加した。このことから, AUTAC4 はミトコンドリア上に FBnG タグを送達したこと, 届けられた FBnG タグが機能したことを確認できた。

次に、AUTAC4 の処理が、ミトコンドリア分解を引き起こすかどうか検証した。2.1.4.3.と同様に、HeLa 細胞に対して AUTAC4 (10 μ M) を 10 時間処理した後、CCCP (10 μ M) を添加した。その結果、CCCP 添加から 2 時間後に、ミトコンドリアタンパク質の減少が観察された。また、HaloTag を使った解析と同様に、ミトコンドリアの新生もみられた。

これらのミトコンドリアレベルの変化を経時的に追跡するために、生細胞内でミトコンドリアを観察した。EGFP-Omp25 (mito-EGFP) を発現した HeLa 細胞に MitoTrackerRed (MTR) を処理し (30 分間の処理後洗浄除去した)、ミトコンドリアを 2 つの方法でラベルした。EGFP-Omp25 は常にミトコンドリアの総量を示し、MTR は実験開始時に存在したミトコンドリアの量を示す。つまり、ミトコンドリアの分解が起きれば両蛍光が減弱し、合成が進めば EGFP-Omp25 の蛍光のみが回復する。ミトコンドリア染色後、AUTAC4 (10 μ M) を 10 時間処理し、その後 CCCP を添加してさらにインキュベートした。この間、ミトコンドリアの挙動を蛍光顕微鏡で生細胞観察すると、CCCP 処理後に mito-EGFP と MTR の蛍光が共に減弱し、さらにその後 EGFP-Omp25 のみが回復した。

2.1.4.5. AUTAC4 の細胞保護効果

2.1.4.4.でみられたミトコンドリアのターンオーバーの促進により、ミトコンドリア機能が改善したかどうかを、JC-1 染色により解析した。HeLa 細胞において AUTAC4 (10 μ M) を 10 時間処理した後 CCCP (10 μ M) を添加した。AUTAC4 処理細胞では非処理細胞に比べ、JC-1 赤色蛍光 (正常ミトコンドリア) がより強く観察された。それに加えて、ミトコンドリアのエネルギー産生能力を調べるために細胞内 ATP 濃度測定を行った。その結果、AUTAC4 (10 μ M) 処理の下で CCCP (10 μ M) 処理した細胞では、AUTAC4 非処理の細胞と比べて ATP 濃度が 1.25 倍上昇した。この結果は、AUTAC4 処理分解に伴って、正常なミトコンドリアが新生することが分かる。また、TUNEL 解析の結果から AUTAC4 (10 μ M) を処理した細胞では、CCCP (10 μ M) に対する耐性が有意に現れた。機能不全ミトコンドリアの除去による細胞保護を化合物で達成した。

2.1.4.6. AUTAC4 のダウン症由来細胞に対する効果

前節までの研究で、機能不全ミトコンドリアを排除する化合物を創出できた。筆者は、この手法を疾患モデルに応用したいと考えた。そこで、ダウン症由来細胞を用いて、AUTAC4 の効果を検証することにした。ダウン症は、ヒト 21 番染色体のトリソミーに由来する遺伝病であるが、ミトコンドリア機能不全がダウン症共通の特徴として知られる。例えば、ATP5A や MTCO1 など、電子伝達系に関係するタンパク質の発現が有意に抑えられているとの報告がある(Liu et al., 2017)。実験には、ダウン症男児由来線維芽細胞 Detroit532 細胞を使った。多くの報告と一致して、Detroit532 細胞のミトコンドリアは異常な膜電位を示し、ミトコンドリアの形態は細かく断片化されていた。Det532 細胞を AUTAC4 (10 μ M) 存在下 3 日間培養すると、ミトコンドリアの膜電位と形態の両方が改善した。そのときのミトコンドリアの活性を調べるために細胞内 ATP 濃度を測ると、AUTAC4 (10 μ M) 処理細胞により 1.5 倍の ATP が細胞内で生成されていた。

オートファジー後期過程阻害剤バフィロマイシン A1 を AUTAC4 (10 μ M) と同時に処理した細胞では、それらの効果が認められなかったことから、オートファジーを介した効果であることが分かる。Mtpagy dye (Dojindo) を利用した解析からも、ミトコンドリアのオートファジー分解が起きたことを確認した。Mtpagy dye は、オートファジーによってリソソームに取り込まれ酸性化したミトコンドリアを蛍光で検出する試薬である。

次に、ミトコンドリアの分解を 2.1.4.4.と同様の方法で生細胞観察した。その結果、AUTAC4 (10 μ M) の添加後から 20-30 時間の時期にミトコンドリアの分解 (MTR 蛍光の減弱) がみられた。一方で、ミトコンドリアの総量 (mito-EGFP 蛍光) はほとんど変化しなかったため、ミトコンドリアが新生されたことが分かる。そのことは、ミトコンドリアの生合成に関与する AMPK-PGC1 α 経路の活性化がみられたことから支持された。また、AUTAC4 処理開始から 30 時間後には、ほぼすべてのミトコンドリアから TMR 蛍光が消失していることから、完全にミトコンドリアが入れ替わったといえる。

以上のことから、ミトコンドリア機能が恒常的に抑制された疾患モデル細胞においても、AUTAC4 がミトコンドリアのオートファジー分解を介してその機能を改善することができるこ

とが分かった。

2.1.5. S-グアニル化を起点とするオートファジーの開始メカニズム

本研究で筆者は、S-グアニル化修飾が単独で、オートファジー分解の目印としてはたらくことを示した。しかし、S-グアニル化を起点としてオートファジーが起こるメカニズムは分かっていない。1.2.4.で述べたように、選択的オートファジーの開始メカニズムにはいくつかの説がある。筆者は、S-グアニル化がULK1複合体を介してオートファジーを引き起こしているかどうか検証した。

2.1.5.1. S-グアニル化を介したオートファジーのULK1複合体への依存性

現在のところ、S-グアニル化が関与する選択的オートファジーとして唯一知られる、細胞内に侵入したA群連鎖球菌（GAS）の排除に、ULK1複合体が必要かどうか検証した。そのために、ULK1複合体の構成要素であるFip200を欠損させたマウス胎児線維芽細胞（MEF）において、次の2点を解析した。すなわち、GASを囲みこむオートファゴソーム（GcAV）の形成と、細胞内に存在する細菌の生存率である。その結果、野生型MEF細胞と同様、Fip200欠損MEF細胞においてもGcAVは問題なく形成され、細菌の生存率が低下した。このとき、細菌の周囲には、S-グアニル化とともにK63型ユビキチン鎖とアダプタータンパク質p62もリクルートされた。これらの結果は、少なくとも細胞内に侵入したGASを排除するS-グアニル化を介したオートファジーはFip200を必要としないことを示している。

しかし、細菌生存率のデータ単独では、S-グアニル化を介してGASを排除する機構がオートファジーとはいいきれない。なぜなら、GASは、ファゴソームーリソソーム経路でも殺菌されるからである。そこで、いくつかの点を検証した。第一は、GASを取り囲む膜構造の形態である。ファゴソーム膜は一重膜であるのに対して、オートファゴソームは二重膜の袋状の構造をとる。Fip200欠損MEF細胞にGASを感染（2時間）させた条件で、電子顕微鏡による観察を行うと、GASが二重膜の膜構造によって捕捉されている様子が観察された。この結果は、オートファジーがGAS排除に関わることを示す。第二に、GASのファゴソームからの脱出が必要かどうかであ

る。ファゴソーム-リソソーム経路では、細胞侵入性細菌はファゴソームから抜け出さないままリソソームで殺菌される。一方、GAS はファゴソームから細胞質へ脱出することが知られており、そのような細菌はオートファジーによって分解される。そこで、ファゴソームを脱出するための毒素 SLO を生産できない GAS 株を感染させ、LC3 のリクルートを観察した。その結果、SLO 生産不全の GAS を感染させた細胞では、GcAV は観察されなかった。そのため、LC3 は、ファゴソームではなく、細胞質に脱出した細菌に対して集積することが示唆される。この結果も、GAS の排除がオートファジーによるものであることを示唆している。

S-グアニル化によるオートファジーは、感染条件でなくとも 8-ニトロ cGMP の処理によって誘導できる。伊藤・斎藤の研究では、8-ニトロ cGMP 処理により LC3B ドットが形成されること、ならびに LC3-II が増加することを示した。一方、S-グアニル化の能力をもたない 8-ブロモ cGMP 処理では、LC3B ドット形成がみられないことから、8-ニトロ cGMP が S-グアニル化を介してオートファジーを誘導していることが示唆された。

そこで、8-ニトロ cGMP によるオートファジーが、S-グアニル化を介した GAS 排除オートファジーと同様、Fip200 に依存しない経路で開始されるかどうかを調べた。8-ニトロ cGMP (100 μ M) は、Fip200 欠損 MEF 細胞でも LC3 ドットの形成を促した。LC3B ドットは、オートファジーフラックスが滞ることでも蓄積することを考慮し、フラックスが正常であることを確かめるため、細胞内 p62 レベルをウェスタンブロットで解析した。p62 は、選択的オートファジーにおいてアダプターとして働くが、通常のオートファジーの場合も p62 が選択的基質となることが知られる。そのため、オートファジーフラックスの簡便な解析として、p62 の減少を解析する方法がある。8-ニトロ cGMP (100 μ M) 処理によって p62 が減少することから、オートファジー後期過程の異常による LC3 ドットの蓄積ではないことが分かる。

これまでの結果を考えると、HaloTag (HT) タンパク質への FBnG タグ導入の際に起こる EGFP-HT 分解 (2.1.1.項) も、Fip200 に依存していない可能性が高い。そこで、Fip200 欠損 MEF 細胞に EGFP-HT を発現させ、FBnG-HTL (10 μ M) 処理したところ、予想した通り EGFP-HT の分解が観察された。このことは、S-グアニル化を起点とするオートファジーが Fip200 に依存

しない新しいオートファジー開始機構によって誘導されることを示している。

2.1.5.2. S-グアニル化を介したオートファジーへの Rubicon の影響

Rubicon は、オートファジーに関わる PI3K 複合体の構成要素であり、Atg14L と相互排他的に PI3K 複合体に加わる(Liang, 2010)。Atg14L が Rubicon に置き換わった PI3K 複合体はオートファジーを負に制御することが知られる。そこで、S-グアニル化に基づくオートファジーにおける Rubicon の影響について検討した。Rubicon を欠損した MEF 細胞に GAS を感染させ、LC3 の集積や細菌の生存率を解析した。その結果、Rubicon 欠損細胞でも GcAV は観察され、細菌の生存率も時間依存的に低下した。むしろ、野生型細胞に比べて細菌排除が効率よく進んでいる。これは、Rubicon はオートファジーを負に制御しているため、Rubicon の欠損により GAS のオートファジー分解が促進された結果と考えることができる。

2.2. 考察

2.2.1. オートファジー分解のスタンダードアローンタグ：S-グアニル化

伊藤らは、GAS 表面の S-グアニル化が細菌のユビキチン化を促進し、選択的オートファジーによる GAS の認識に貢献することを示したが、細菌に特有の別の因子が S-グアニル化とともに必要とされる可能性が残されていた(Ito et al., 2013)。筆者は、細菌感染のない状態で、いくつかの哺乳類細胞内のタンパク質を人工的に S-グアニル化した。本研究は、S-グアニル化に基づく選択的オートファジーにおいて細菌成分は必要でないことを示している。

2.2.2. S-グアニル化によって生成するオートファゴソームのサイズ

GAS の選択的オートファジーでは、GAS-containing autophagosome-like vacuole (GcAV) と呼ばれるオートファゴソームが形成されて細菌を隔離する(Nakagawa et al., 2004)。オートファゴソームは、通常、直径 0.5-1 μm であるが、GcAV はサイズが大きく、直径約 10 μm ほどにもなる。しかし、HaloTag 技術や AUTAC を使って、タンパク質やミトコンドリアに S-グアニル化を導入した場合、オートファゴソームのサイズは通常と変わりなかった。GcAV の前駆体となる隔離膜の伸長には、宿主由来の Rab タンパク質が関与するが、細菌由来の何らかの因子も関わっているのかもしれない。S-グアニル化単独で誘導されるオートファゴソームと、GcAV の構成成分の類似性比較は今後の研究課題として価値がある。

2.2.3. 新規分解タグ FBnG を利用した AUTAC 法の開発

筆者は、膜透過性がより優れた新規分解タグ FBnG を見出し、基質特異的分解を促すキメラ化合物 Autophagy-targeting chimera (AUTAC) を開発した。

疾患原因として、単一のタンパク質だけでなく、タンパク質複合体や凝集体、細胞小器官などが重要視されている。これらの排除には、基質の大きさや複雑さに左右されない分解系を使う必

要があり、AUTAC による特異的なオートファジー誘導は非常に価値がある。

2.2.4. オートファジーを誘引するユビキチン化

ミトコンドリアに、K63 型ユビキチン鎖、または K48 型ユビキチン鎖を導入した実験 (2.1.4. 節) は、マイトファジー誘導に必要なユビキチン鎖に関する有用な情報を与えた。マイトファジーは、大きく分けてユビキチン化を介するものと介さないものがあるが、前者の場合は、共通したユビキチン結合様式が用いられる可能性があるからである。

S-グアニル化に関係しない研究では、特定の位置のリシン残基を、アルギニンに置換したユビキチン変異コンストラクトを強制発現させた細胞実験から、K6 型, K11 型, K48 型, K63 型ユビキチン鎖がマイトファジーに関与すると提案されている (Harper et al., 2018)。今回、K48 型ユビキチン修飾を触媒するユビキチン E3 リガーゼ:CRBN をリクルートする PROTAC を使用して、ミトコンドリア外膜の K48 型ユビキチン化を行なった。多くのオートファジー受容体は、K48 型ユビキチン鎖にも親和性を示すが、マイトファジーを誘導しなかった。一方 AUTAC は、ミトコンドリアへの K63 型ユビキチン鎖をリクルートし、マイトファジーを誘導した。他の結合型のユビキチン鎖について系統的に調べていないが、K63 型ユビキチン鎖のマイトファジーにおける重要性が示唆された。

2.2.5. Asymmetric fission の検証法としての AUTAC

本研究では、mito-AUTAC (AUTAC4) の効果を調べるために、ダウン症由来細胞 (Detroit532 細胞) を使用した。ダウン症は最も頻度が多い遺伝性疾患である。ミトコンドリアの機能不全は、心疾患、難聴など、ダウン症に頻繁に見られる症状 (ミトコンドリア病) と関係する (Izzo et al., 2018)。現状では、染色体そのものを治療する方法がないため、ミトコンドリア機能を改善する治療アプローチが期待される (Valenti et al., 2018)。AUTAC4 は、ミトコンドリアの断片化に依存したマイトファジーを引き起こした。ミトコンドリアの機能低下により、ミトコンドリアは断片化し、正常なミトコンドリアから積極的に切り出される (asymmetric fission) (Twig et al., 2008)。

AUTAC4 は、ミトコンドリア外膜上の TSPO タンパク質を標的としており、ミトコンドリアの品質に関わらずミトコンドリア外膜を S-グアニル化するが、傷害に伴って切り出されたミトコンドリアが優先的に分解したと考えられる。しかし、分解の鍵となる asymmetric fission が、何を感知して起こるか分かっていない。したがって、様々なミトコンドリアの異常（例えば mtDNA 変異）が asymmetric fission を引き起こすかどうか調べる必要がある。その上で、ミトコンドリア病細胞などを用いた AUTAC4 の効果の検証をしていく予定である。

2.2.6. S-グアニル化基質のオートファジー分解のメカニズム

水島の総説によれば、選択的オートファジーには、少なくとも 4 つの異なる機構が関わっている (Mizushima, 2018)。すなわち、a) ユビキチン化された分解基質がアダプタータンパク質を介してオートファゴソーム (LC3) に繫留される、b) 分解基質と結合したアダプタータンパク質が LC3 だけでなく ULK1 複合体（開始因子）とも直接相互作用することで基質の周囲でオートファジーを起こす、c) オートファゴソーム形成部位に分解基質が集積する、d) 分解基質を含んだ液滴に沿ってオートファゴソームが伸長する機構である。2.1.1.や 2.1.2.で示したように、S-グアニル化された基質の分解に K63 型ユビキチン化とアダプタータンパク質 p62 が重要であることから、機構 a) を使っていることが示唆される。機構 b) の関与を調べるために、ULK1 の構成要素 Fip200 を欠損した細胞を利用して解析したが、S-グアニル化に基づくオートファジーは ULK1 の構成要素 Fip200 に依存しなかった。S-グアニル化が ULK1 を介さずにどのようにオートファジーを開始するのかさらに調べる必要がある。一方、機構 c) や d) の関与については十分に検証していない。機構 d) においては、液滴形成のために p62 や K63 型ユビキチン鎖が重要であるとの報告もあり (Sun et al., 2018; Zaffagnini et al., 2018), S-グアニル化に基づくオートファジーと共通項があるため、今後検討していく予定である。

2.2.7. S-グアニル化された基質の分解と LC3-associated phagocytosis (LAP) との関係

オートファジーと類似の ULK1 複合体に依存しない経路として LAP が知られている。LAP

は、細胞外からファゴサイトーシスによって取り込まれた物質、特に細菌の分解過程を指す。通常、ファゴソーム内部の異物はリソソームとの融合によって分解される。このファゴソーム-リソソーム経路には本来 LC3 は関与しない。しかし一部で、ファゴソーム膜に LC3 の局在が起こることが確認され、LAP と名付けられた(Lai and Devenish, 2012; Martinez et al., 2015)。LAP においては、LC3 陽性の膜構造が形成し、多くのオートファジー関連因子に関わるという点でオートファジーに似ているが、ULK1 複合体に依存しない大きな特徴をもつ。これらの特徴から、Fip200 に依存しない GAS の排除は LAP によるとも考えられた。しかし、二重膜のオートファゴソームが観察されることや GAS のファゴソームからの脱出が LC3 のリクルートに必要であることは、LAP について現在報告されている知見と矛盾する。また、オートファジーを負に制御する Rubicon を含んだ PI3K 複合体が LAP を促進するため、Rubicon 欠損細胞において LAP は抑制されるという報告があるが、2.1.5.において、GAS の排除は問題なく行われた。この点からも GAS 排除は LAP によるものではないことが支持される。

リソソームの発見者としても知られる Christian de Duve は、オートファジーに対してヘテロファジーを次のように定義している(Harnett et al., 2017)。すなわち、前者は細胞内の分子を、後者は細胞外から取り込んだ分子をリソソームで分解する。この定義に照らせば、ファゴソームを破り細胞質に脱出した細菌を捕捉するのはオートファジーであると考えている。

3. 結論

筆者は、基質の S-グアニル化修飾が選択的オートファジー分解を起こすタグとして単独で働くことを証明した。続いて、S-グアニル化修飾に含まれる cGMP 構造の合成化学的変換を行い、オートファジータグとしてより優れた人工的な改良 S-グアニル化タグ (FBnG タグ) を開発した。

また、標的タンパク質の低分子リガンドと、FBnG タグを両端にもつキメラ分子 (AUTAC) を開発し、内因性タンパク質を狙って分解することに成功した。さらに、ミトコンドリア分解を行う AUTAC4 を開発し、ダウン症由来細胞 (Detroit 532) の機能不全ミトコンドリアの分解を介して、ミトコンドリア形態の正常化や膜電位の向上を確認した。現在、ミトコンドリアの機能不全に由来する疾患の治療がほぼ対症療法であるなかで、ミトコンドリアを直接分解するアプローチは新しく、根本的な治療へとつながる期待がある。

一方で本手法の大きな課題のひとつは、標的に分解タグをリクルートする低分子リガンドの不足していることである。これまで、低分子リガンドは、標的タンパク質に結合し、かつ機能を阻害（または促進）する化合物がスクリーニングされてきたが、本手法には、標的への結合の条件だけで充分である。そのような分子を天然物からスクリーニングしなおす必要があると考えている。

筆者は、S-グアニル化を起点とするオートファジーのメカニズムとして、K63 型ユビキチン鎖が関与すること、アダプタータンパク質として主に p62 が関与することを見出した。また、飢餓応答のオートファジーの開始を司る ULK1 複合体の構成タンパク質に依存しないことを見出した。この点は、飢餓によって引き起こされるオートファジーと、基質選択的に起こるオートファジーとの違いを議論する上で非常に興味深い。

4. 参考文献

- Braun, P.D., Barglow, K.T., Lin, Y.-M., Akompong, T., Briesewitz, R., Ray, G.T., Haldar, K., and Wandless, T.J. (2003). A bifunctional molecule that displays context-dependent cellular activity. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 7575–7580.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell* *125*, 1241–1252.
- Ciechanover, A. (2015). The unravelling of the ubiquitin system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 322–324.
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Felletar, I., et al. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* *468*, 1067.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Levine, B., Green, D.R., and Kroemer, G. (2017). Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nature Reviews Drug Discovery* *16*, 487–511.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* *284*, 12297–12305.
- Griparic, L., Kanazawa, T., and van der Bliek, A.M. (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* *178*, 757–764.
- Harnett, M.M., Pineda, M.A., Latré, P. de L., Eason, R.J., Besteiro, S., Harnett, W., and Langsley, G. (2017). From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed J* *40*, 9–22.
- Harper, J.W., Ordureau, A., and Heo, J.-M. (2018). Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 93–108.
- Hidvegi, T., Ewing, M., Hale, P., Dippold, C., Beckett, C., Kemp, C., Maurice, N., Mukherjee, A., Goldbach, C., Watkins, S., et al. (2010). An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* *329*, 229–232.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1981–1991.
- Ito, C., Saito, Y., Nozawa, T., Fujii, S., Sawa, T., Inoue, H., Matsunaga, T., Khan, S., Akashi, S.,

Hashimoto, R., et al. (2013). Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. *Mol. Cell* *52*, 794–804.

Izzo, A., Mollo, N., Nitti, M., Paladino, S., Cali, G., Genesio, R., Bonfiglio, F., Cicatiello, R., Barbato, M., Sarnataro, V., et al. (2018). Mitochondrial dysfunction in down syndrome: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Mol Med* *24*, 2.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1992–2003.

Khvorova, A., and Watts, J.K. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology* *35*, 238–248.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.

Kwon, Y.T., and Ciechanover, A. (2017). The ubiquitin code in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Trends in Biochemical Sciences* *42*, 873–886.

Lai, S.-C., and Devenish, R.J. (2012). LC3-associated phagocytosis (LAP): connections with host autophagy. *Cells* *1*, 396–408.

Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 759–774.

Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* *469*, 323–335.

Liang, C. (2010). Negative regulation of autophagy. *Cell Death and Differentiation* *17*, 1807–1815.

Liu, Y., Borel, C., Li, L., Müller, T., Williams, E.G., Germain, P.-L., Buljan, M., Sajic, T., Boersema, P.J., Shao, W., et al. (2017). Systematic proteome and proteostasis profiling in human Trisomy 21 fibroblast cells. *Nat Commun* *8*, 1212.

Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M.G., Learish, R., Ohana, R.F., Urh, M., et al. (2008). HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* *3*, 373–382.

Martinez, J., Malireddi, R.K.S., Lu, Q., Cunha, L.D., Pelletier, S., Gingras, S., Orchard, R., Guan, J.-L., Tan, H., Peng, J., et al. (2015). Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals

distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nature Cell Biology* *17*, 893–906.

Matsui, M., and Corey, D.R. (2017). Non-coding RNAs as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* *16*, 167.

McNaught, K.S., Olanow, C.W., Halliwell, B., Isacson, O., and Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 589–594.

Mizushima, N. (2018). A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature Cell Biology* *20*, 521.

Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* *147*, 728–741.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* *140*, 313–326.

Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* *306*, 1037–1040.

Nishikawa, M. (2016). Nucleic Acid Drugs and DNA-based Delivery Systems. *Drug Discov Ther* *10*, 271–272.

Pérez-Salvia, M., and Esteller, M. (2017). Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics* *12*, 323–339.

Riley, B.E., Kaiser, S.E., Shaler, T.A., Ng, A.C.Y., Hara, T., Hipp, M.S., Lage, K., Xavier, R.J., Ryu, K.-Y., Taguchi, K., et al. (2010). Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: a potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. *J. Cell Biol.* *191*, 537–552.

Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine* *10*, S10–S17.

Rupprecht, R., Papadopoulos, V., Rammes, G., Baghai, T.C., Fan, J., Akula, N., Groyer, G., Adams, D., and Schumacher, M. (2010). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* *9*, 971–988.

- Russ, A.P., and Lampel, S. (2005). The druggable genome: an update. *Drug Discov. Today* *10*, 1607–1610.
- Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., et al. (2007). Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 727–735.
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., and Dikic, I. (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death and Differentiation* *20*, 21–30.
- Sin, N., Meng, L., Wang, M.Q., Wen, J.J., Bornmann, W.G., and Crews, C.M. (1997). The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 6099–6103.
- Stolz, A., Ernst, A., and Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* *16*, 495–501.
- Sun, D., Wu, R., Zheng, J., Li, P., and Yu, L. (2018). Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Research* *28*, 405.
- Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* *482*, 414–418.
- Toure, M., and Crews, C.M. (2016). Small-Molecule PROTACS: New Approaches to Protein Degradation. *Angew. Chem. Int. Ed.* *55*, 1966–1973.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* *27*, 433–446.
- Valenti, D., Braid, N., De Rasmio, D., Signorile, A., Rossi, L., Atanasov, A.G., Volpicella, M., Henrion-Caude, A., Nabavi, S.M., and Vacca, R.A. (2018). Mitochondria as pharmacological targets in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* *114*, 69–83.
- Winter, G.E., Buckley, D.L., Paulk, J., Roberts, J.M., Souza, A., Dhe-Paganon, S., and Bradner, J.E. (2015a). Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* *348*, 1376–1381.
- Winter, G.E., Buckley, D.L., Paulk, J., Roberts, J.M., Souza, A., Dhe-Paganon, S., and Bradner, J.E. (2015b). Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* *348*, 1376–1381.

Zaffagnini, G., Savova, A., Danieli, A., Romanov, J., Tremel, S., Ebner, M., Peterbauer, T., Sztacho, M., Trapannone, R., Tarafder, A.K., et al. (2018). p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy. *EMBO J.* 37.

高橋永利子 (2012). 平成 23 年度 修士論文 蛍光プローブを用いた 8-nitro-cGMP の標的タンパク質探索.